

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 017659

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2013.02.28

(51) Int. Cl. A61K 36/15 (2006.01)
A61K 31/125 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201001289

(22) Дата подачи заявки
2010.09.10

(54) ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ ТЕРПЕНОИДНАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ
С АНГИОГЕНЕЗИНГИБИРУЮЩИМ ДЕЙСТВИЕМ

(43) 2011.04.29

(56) RU-C1-2198653
RU-C1-2054945

(86) PCT/RU2008/000147

Shi YP et al. New terpenoid constituents from
Eunicea pinta. J Nat Prod. 2002 Sep;65(9): 1232-41
[найдено 2008-11-17]. Найдено из Интернет:
<URL:<http://www.Entrez-PubMed>, PMID: 12350138
RU-C1-2338547

(87) WO 2009/113902 2009.09.17

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ИНИТИУМ-ФАРМ" (RU)

(72) Изобретатель:

Пинигина Нина Максимовна,
Лацерус Людмила Анатольевна,
Барышников Анатолий Юрьевич,
Маганова Фания Иршатовна, Козлов
Алексей Михайлович, Смирнова Зоя
Сергеевна (RU)

(74) Представитель:

Агуреев А.П. (RU)

(57) Изобретение относится к медицине и химико-фармацевтической промышленности и касается средства для лечения заболеваний, связанных с нарушением регуляции ангиогенеза, в частности к способу лечения онкологических заболеваний различного генеза путем индукции ингибирования ангиогенеза на фоне прямого противоопухолевого, антирецидивного и антиметастатического воздействий, а также сопутствующей активации эндогенной системы апоптоза. Изобретение реализуется при использовании новой пероральной лекарственной формы, содержащей ингредиенты, относящиеся к классу природных терпеновых соединений (изопреноидов), полученных из хвойных деревьев семейства Pinaceae, включающей: секвiterпеноиды (3-6%), нейтральные дитерпеноиды (11-15%), дитерпеновые кислоты (23-28%), тритерпеновые кислоты (8-16%), ненасыщенные и насыщенные жирные кислоты (0,1-0,3%), фенольные соединения (0,1-0,2%) и монотерпеноиды остальное, с содержанием борнилацетата не менее 10,0% от общего состава терпенов. Предполагается, что применение новой пероральной лекарственной формы для субстанции которой известны иммуномодулирующие, антибактериальные, противовоспалительные, обезболивающие, ранозаживляющие и другие фармакологически значимые действия, а также отсутствие противопоказаний, токсических эффектов и возможность комплексного использования с различными агентами, реализует новый терапевтический подход и повысит эффективность лечения онкологических и многих других заболеваний, связанных с нарушением процессов ангиогенеза.

B1

017659

017659
B1

Изобретение относится к медицине и химико-фармацевтической промышленности и касается выявления лекарственного средства, способного индуцировать процесс ингибирования системы ангиогенеза, а в случае использования для лечения онкологических заболеваний различного генеза, наряду с этим, оказывать активирующее воздействие на эндогенную систему апоптоза, на фоне запуска антирецептивных и антиметастатических проявлений.

Лекарственное антиангиогенное средство, индуцирующее эти процессы, является нетоксичной, фармацевтической композицией "Абисилин", созданной на основе терпенов (изопреноидов) хвойных деревьев, включающей следующие компоненты: монотерпеноиды, сесквитерпеноиды, нейтральные дитерпеноиды, дитерпеновые кислоты, тритерпеновые кислоты, фенольные соединения, ненасыщенные и ненасыщенные жирные кислоты.

Данное изобретение может быть использовано при лечении большого количества заболеваний, связанных с нарушением регуляции ангиогенеза, наряду с онкологическими - это прежде всего заболевания вызванные неоваскуляризацией глаз - ретинопатиями или возрастных дегенераций желтого пятна, а также при пролиферативных нарушениях мезангимальных клеток - в случаях хронических и острых заболеваний почек (гломерулонефрит), при псориазе, развитии атером, артериальном рестенозе, диабете, ревматоидном артите, хронической астме, эндометриозе, аутоиммунных заболеваниях, артериальном или посттрансплатационном атеросклерозе и многих других.

Предшествующий уровень техники

Широкий поиск соединений, ведущийся в настоящее время, с ангиогенезингирующим и апоптоз активирующим действием обусловлен существующей теоретической возможностью выявления новых лекарственных противоопухолевых средств с более высоким терапевтическим эффектом.

Возможность ингибировать рост не только первичной опухоли, но и ее метастазов, обнаружена у нового типа противоопухолевых средств - антиангиогенных препаратов, впервые предложенных в 1971 г доктором Иудой Фолкменом (Folkman J. Tumor angiogenesis therapeutic implication N Engl J Med. 1971; 285: 1182-6). Антиангиогенные препараты обладают целым рядом преимуществ в сравнении с традиционными противоопухолевыми химиопрепаратами, а именно: избирательностью действия, снижением риска побочных эффектов, развитием лекарственной устойчивости, снижением уровня токсичности.

Антиангиогенные препараты, блокируя процесс формирования кровеносных сосудов в опухоли замедляют или останавливают ее рост и предотвращают развитие метастазов.

Возможностей осуществить этот процесс существует множество, так как речь идет не о прямом поражении опухолевых клеток с особым регуляторным механизмом, а о регуляции жизнедеятельности обычных эндотелиальных клеток с большим количеством клеточных мишенией - ингибирование пролиферации и/или миграции, блокада процессов дифференциации клеток, нейтрализация ангиогенных факторов роста - ти-розинкиназного рецептора CHER-1, воздействие на сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) и на систему ангиопоэтин/рецептор TIF, ингибирование ангиогенных факторов роста VEGFR-2 и VEGFR-3 и их специфических рецепторов, а также матриксных металлопротеиназ.

Нормальная функциональная реактивность эндотелиальных клеток делает ее легко уязвимой еще и потому, что ее функционирование определяется также другими клеточными системами организма.

Это множество мишенией позволило выдвинуть ряд потенциальных антиангиогенных блокаторов. Однако для известных антиангиогенных средств отмечаются только отдельные необходимые преимущества.

Так, например, известен наиболее перспективный противоопухолевый препарат Авастин - из фармакологической группы антитела моноклональные, с механизмом антиангиогенного действия, способный снижать процесс васкуляризации и угнетать рост опухоли за счет селективного связывания с биологически активным фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) (US патент № 60542297; US патент № 6639055).

Однако клиническая эффективность его применения - увеличение общего периода выживания с 15,6 до 20,3 месяцев у больных с метастазирующими колоректальным раком или с 13,6 до 17,7 месяцев по сравнению с назначением только химиотерапии побуждает к поиску более результативных средств. Тем более, что при этом имеется внушительный список противопоказаний и побочных действий.

Логически также предполагалось, что ингибиторы ангиогенеза, блокирующие химические сигналы, способствующие росту новых кровеносных сосудов, могут быть эффективны при любых видах опухолей, так как эти процессы являются общими.

Результаты клинических испытаний Авастина опровергают такие теоретические предпосылки.

Известны также комбинации и композиции, которые оказывают воздействие на функцию систем VEGP/рецептор VEGF и ангиопоэтин/рецептор TIE, способные повышать ингибирование васкуляризации и могут быть использованы для лечения рака (RU 229221, С2 от 20.06.2001) Эти множественные соединения оказывают воздействие в многоступенчатом механизме антиангиогенного действия только на единичные аспекты этого процесса, что незначительно сказывается на повышении эффективности противоопухолевого агента. Исследования воздействий на систему ангиопоэтин/рецептор Tie2 показали, что они приводят лишь к замедлению роста экспериментальных опухолей (Siemeister и др. Cancer Res. 59, 3185-3191, 1999).

Известны N-ариламиды аитраниловой кислоты и тиоантраниловой кислоты, ингибирующие активность тирозинкиназного Fit-1 рецептора VEGF, связанные с неопластическими заболеваниями и ангиогенезом. При их использовании отмечается незначительная терапевтическая эффективность. При этом известные антиангиогенные препараты, блокируя процессы гиперпрофилерации - например в случае развития ревматоидного артрита или псориаза, не оказывают противовоспалительного, иммуномодулирующего, обезболивающего и других видов активности, позволяющих купировать процесс.

Процесс пролиферации синовиоцитов и ангиогенез является также признанным фактором в развитии ревматоидного артрита. При этом, патологический рост сосудов может быть вызван хроническим системным иммуноопосредованым воспалительным заболеванием.

Существующие средства для лечения ревматоидного артрита - ауротиоглюкоза, гидроксихлорохин, Д-пеницилламин, циклоспорин А и многие другие, в том числе способные предупреждать развитие ангиогенеза (метотрексат), а также вновь предложенные (RU № 2088238; RU № 2199320) облегчают состояние и развитие заболеваний, но не прерывают их течение и развитие. Предлагаемые препараты и терапии при длительном использовании вызывают очень серьезные побочные эффекты: гепатит, дерматит, тромбоцитопения, миастения гравис, панкреатит, цирроз печени, легочный фиброз и многие другие,

Ангиогенез также является признанным фактором в развитии псориаза, так как основу патологических изменений, в течение этого заболевания, составляет гиперпролиферация эпидермиса с нарушением дифференциации клеток и воспалительной инфильтрацией эпидермиса и дермы.

Известно множество средств и способов лечения псориаза (RU № 2036640; RU № 92007126; RU № 2123334; RU № 2200017), однако, клинические показатели предложенных антисориатических средств (смесь этиловых эфиров полиеновых жирных кислот омега-3, тигазола, метотрексата, иммуноактивных, психотропных, антигиста-минных, гормональных) в основном являются неудовлетворительными, так как ремиссия бывает кратковременной, не способной ингибировать рентгенологическое прогрессирование.

Несмотря на то что в настоящее время при развитии псориаза большая роль отводится процессу ангиогенеза, анти-ангиогенная терапия не является необходимой и доминирующей, так как такие средства и способы - это препараты нового поколения.

Новый подход в борьбе с различными заболеваниями с помощью анти-ангиогенных препаратов позволяет их использовать самостоятельно или в комбинации со стандартными методами терапии.

Наиболее близким к настоящему изобретению, по спектру биологического действия и источнику получения, является противоопухолевое средство Паклитаксел (Таксол), эффективно подавляющее пролиферацию эндотелиальных клеток, т.е. являющегося ингибитором ангиогенеза (Klauber N. и др., Cancer Res., 57, 81-86, 1997).

Впервые Таксол был разработан на основе дитерпеноидов сложного строения - таксанов, выделенных в 1971 г. из коры тихоокеанского тиссowego дерева (*Taxus brevifolia* Nutl). В настоящее время известны способы полного синтеза Таксола и его аналогов (USA A1, N 5488116, Jan. 1966, RU N 2196581 от 04.05.2000). Получен полусинтетический аналог Таксола - доцетаксел (Таксотер), выделенный из сырья европейского тиса (*Taxus baccata*), а также R-тетраол, созданный с использованием природных терпеноидных комплексов, с применением живиц хвойных пород видов *Pinus sibirica* и/или *Pinus cembra*, и/или рода *Abies*, и/или рода *Larix* (RU 2051900 C1, 10.01.96), на основе которых его получают путем выделения активного ингредиента из натурального продукта или полусинтетическим путем (RU 2196581, C2, 04.05.2000) с использованием фракции лабданоидодитерпеновых кислот с добавлением камфоры и воздействием на полученную смесь γ -излучением до формирования структуры R-тетраола.

Недостатками этих соединений, полученных указанными способами, является отмечаемая для всех препаратов та или иная степень токсичности (нейтропения, фибрильная нейтропения, инфекции, рвота, диарея, стоматит, астения, неврологические (моторные) и гематологические осложнения и т.д.), а также невысокая эффективность, что заставляет искать схемы комбинации таких блокаторов ангиогенеза с другими активными препаратами для осуществления более результативной терапии.

Эти недостатки существующих антиангиогенных терпеноидных препаратов могут быть обусловлены представленными многостадийными схемами их получения, направленными на выделение в чистом виде отдельных действующих веществ, на основе частичного или полного синтеза, что способствует появлению различных видов токсических аспектов, а также лишает их необходимой полиактивности.

Таким образом, несмотря на наличие множества мишеней для ингибирования системы ангиогенеза и ряда созданных средств, существует необходимость в разработке антиангиогенных фармацевтических композиций, способных иметь все преимущества, но быть свободными от имеющихся существенных недостатков, характерных для известных средств:

не оказывать токсического действия;

не иметь противопоказаний;

при использовании (в случае необходимости) в комбинации с цитотоксическими противоопухолевыми препаратами снижать их токсичность и повышать эффективность;

иметь прямую противоопухолевую активность;

оказывать антирецидивное и антиметастатическое действие;

не вызывать резистентности в том числе к апоптозу;

проявлять избирательность в ингибиции системы неоваскуляризации и полностью ее блокировать при развитии различных патологических процессов;

желательно, чтобы полиактивный спектр такого антиангиогенного агента включал иммуномодулирующую, обезболивающую, антибактериальную, противовоспалительную и другие виды активности; быть способным индуцировать апоптоз в клетках.

Это далеко не полный перечень необходимых условий для достижения нужного результата, учитывающий многие имеющиеся недостатки существующих способов и средств.

Из уровня техники неизвестны и не очевидны антиангиогенные агенты, способные одновременно оказывать такие разнообразные полиактивные воздействия при развитии опухолевых процессов.

Сущность изобретения

Целью настоящего изобретения явился поиск и разработка средства, позволяющего проявлять избирательное ингибирирование или полное блокирование системы неоваскуляризации с использованием антиангиогенного противоопухолевого агента, свободного от существующих недостатков известных средств, а именно: не оказывающего токсических побочных действий при длительном использовании, не имеющего противопоказаний, не вызывающего резистентности (в том числе к апоптозу), а также при комплексном использовании с цитостатическими препаратами не только повышающего их эффективность, но и способствующего снижению их токсичности. Кроме того, предлагаемый способ должен иметь ряд преимуществ перед всеми известными блокаторами ангиогенеза - обладать прямым противоопухолевым действием, быть способным индуцировать систему апоптоза в клетках, оказывать антирецидивное и антиметастатическое действие, одновременно проявляя иммуномодулирующее, антибактериальное, ранозаживляющее, противовоспалительное, обезболивающее и другие виды активности.

Теоретически можно было предположить, что быть свободным от существующих недостатков, характерных для известных способов блокирования системы ангиогенеза, а кроме того, иметь еще и ряд таких необходимых преимуществ могут комплексы природных терпеноидов, так как они многокомпонентны и полиактивны.

Авторами настоящего изобретения, в процессе проведения научных исследований, неожиданно было обнаружено, что терпеноидная субстанция Абисил, описанная в патентах (RU № 2054945 от 28.06.1995; RU № 2198653 от 29.03.2002), обладающая, иммуномодулирующим, противовоспалительным, ранозаживляющим, обезболивающим и антибактериальным действием, а также способная осуществлять активацию специфических гуморальных медиаторов нервных окончаний коры головного мозга при патологических состояниях (таких, как рак например) с нарушением синтеза нейромедиаторов (RU № 2244928 от 19.02.2003),

Для получения новой фармацевтической композиции "Абисилин" использовалось также содержимое капсулных экстрактов растений семейства Pinaceae, рода *Abies*.

Однако в ходе исследований биологической активности различных образцов субстанции была выявлена большая вариабельность в зависимости от исходного капсулного содержимого терпенов и полученных монотерпеноидов.

При воздействии различных стрессовых факторов, например, резкого перепада температур, в растительных сообществах рода пихты (*Abies*) происходит переориентация в синтезе вторичных метаболитов и резко возрастает синтез монотерпеноидов и низкомолекулярных жирных кислот. Обогащение исходного капсулного экстракта соединениями, купирующими развитие патологических процессов в растительных клетках, позволяло получить значительные преимущества в активности таких образцов фармацевтической композиции Абисилин.

Поэтому, с целью получения нестандартного набора терпенов, а который синтезируется растительными клетками с целью защиты от неблагоприятных факторов окружающей среды, капсулный экстракт получают на фоне естественных (резкий перепад температур, поражение деревьев различными заболеваниями, паразитирующими мхами, лишайниками, с нарушением кроны и т.д.) или спровоцированных стрессовых ситуациях (простукивание, механическое сдавливание и т.д.).

Такой отличительный признак не использовался ранее при получении различных растительных экстрактов, в том числе и при получении терпеноидной композиции Абисил-1 (RU, патент № 2054945 и RU, патент № 2198653). При исследовании образцов композиции ("Абисилин"), включающих исходные компоненты капсулного экстракта в массовой доле %, а именно: сесквитерпеноиды (3-6%); нейтральные дитерпеноиды (11-15%); дитерпеновые кислоты (8-28%); тритерпеновые кислоты (8 16%); ненасыщенные и насыщенные жирные кислоты (0,1-0,3%); фенольные соединения (0,1-0,2%) и монотерпеноиды (42%), с содержанием борнилацетата не менее 10% от общего состава терпенов на фоне дополнительного обогащения монотерпеноидами (0,02-0,2%) и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель (с содержанием поликактивной фармацевтической композиции 20 мас.% от веса средства); неожиданно было обнаружено, что такая композиция является эффективным ингибитором процесса ангиогенеза при ревматоидном артрите и псориазе, проявляя при купировании опухолевых процессов различного генеза цитотоксическую активность, а также апоптоз индуцированное, антирецидивное и антиметастатическое действие.

Таким образом, поликактивность терпеноидной фармацевтической композиции Абисилин достига-

ется благодаря тому, что в ней используется естественный сложный химический комплекс терпенов, содержащий спровоцированный (по выходу и синтезу) состав для биозащиты от стрессовых факторов у представителей семейства Pinaceae рода пихт (Abies), обогащенный идентичными монотерпеновыми соединениями. При этом было установлено, что использованный прием обогащения естественного комплекса терпенов отдельными наиболее эффективными агентами-монотерпеноидами (путем прямого получения их из исходного сырья), не вызывает возникновения токсических эффектов у конечного продукта, как это характерно при использовании вышеперечисленных антиангиогенных существующих средств. Высокий терапевтический эффект обусловлен не только превосходящей степенью того или иного вида активности, но синергизмом действия всех действующих веществ фармацевтической композиции Абисилин, а именно терпенами (изопреноидами) хвойных деревьев семейства Pinaceae, включающими:

сесквитерпеноиды (3-6%);

нейтральные дитерпеноиды (11-15%);

дитерпеноевые кислоты (23-28%);

тритерпеноевые кислоты (8-16%);

ненасыщенные и насыщенные жирные кислоты (0,1-0,3%);

фенольные соединения (0,1-0,2%);

монотерпеноиды (остальное), с содержанием борнилацетата не менее 10,0% от общего состава терпенов, растворенных в подсолнечном масле.

Таким образом, разработано новое средство-полиактивная терпеноидная фармацевтическая композиция Абисилин, представляющая собой пероральную лекарственную форму-20% масляный раствор, с новым спектром фармакологического действия и новыми возможностями купирования патологических процессов, связанных с нарушением регуляции ангиогенеза, в частности, при развитии злокачественных новообразований, ревматоидного артрита и псориаза.

Кроме того, при разработке противоопухолевой терпеноидной фармацевтической композиции Абисилин с ангиогенезингирующим действием, заложена принципиально новая предполагаемая стратегия-“запуск” выработки структурами мозга собственных эндогенных средств, способных блокировать возникающий дисбаланс в регуляции нормальных физиологических процессов в организме человека и животных, путем использования эндогенных терпеноидных соединений хвойных растений, синтезированных ими для самозащиты в условиях стресса.

Полученный по примеру 1* пероральный полиактивный препарат Абисилин с ангиогенезингирующим и апоптозиндуцирующим действием исследовался на наличие общетоксического действия.

В предпочтительном варианте изобретения исходя из полученных данных по изучению общетоксического действия Абисилин вводят перорально в дозе 80-100 мг/кг веса тела (пример 1).

Предпочтительным вариантом изобретения также является способ индукции избирательного цитотоксического действия на опухолевые клетки и способа вызывать их гибель по типу апоптоза при использовании дозы Абисилина 1000 мкг/мл, так как при этом было выявлено наибольшее количество клеток в сумме положительных по AnV^+Pl^- , AnV^+Pl^+ , AnV^-Pl^+ , по отношению к клеточной линии Jukat и составило 86,6% (пример 2).

Предпочтительным вариантом изобретения является способ индукции противоопухолевого действия препарата Абисилин при его пероральном применении в дозе 10-100 мг/кг тела в течение 2-11 дней, выявленный с использованием необходимого набора перевиваемых солидных опухолей-меланомы B-16, Ca-755, LLC, РШМ-5, Акатол и саркомы М-1 (пример 3).

Предпочтительным вариантом, представляющим собой лечение опухолевых заболеваний различного генеза, является использование фармацевтической композиции Абисилин, которая может быть в форме раствора, таблеток, желатиновых капсул, драже, сиропов, суспензий, порошков, эмульсий, гранулятов, микросфер или наносфер, или других лекарственных форм, которые позволяет осуществлять контролируемое высвобождение активных ингредиентов препарата.

Введение Абисилина совместно с известным противоопухолевым средством-Цисплатином, изученным на перевиваемых опухолях АКАТОЛ, Ca-755 и меланоме-B-16, показало не только возможность синергичного действия при использования Абисилина, но и повышение терапевтической значимости обоих средств.

Предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения является способ смещения естественного баланса между проангиогенным и антиангиогенными медиаторами в сторону доминирования последних при использовании Абисилина в опытах *in vitro* и *in vivo* (пример 4).

Предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения является использование средства Абисилин для индукции антирецидивного и антиметастатического действия при его пероральном использовании в дозах 80-100 мг/кг массы тела (пример 5).

Кроме того, предпочтительным вариантом, представляющим собой лечение ревматоидного артрита, полиартрита при использовании Абисилина перорально из расчета 0,1 мл/кг один раз в сутки в течении 15 дней и местно салфетки с раствором Абисилина (пример 6).

Предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения является использование Абисилина перорально в дозе 0,1 мл/кг один раз в сутки в течение 25 дней и местно салфеток для лече-

ния псориаза (пример 7).

Приведенные ниже примеры 1-7 демонстрируют предпочтительные варианты воплощения описанного изобретения, но не ограничивают объем изобретения.

Пример 1*.

Для получения терпеноидной фармацевтической композиции Абисилин используют капсулные экстракты из различных представителей семейства Pinaceae, рода пихт (Abies), которые получают путем прямого прокола и сбора в светозащитные флаконы.

Однако для естественного обогащения композиции терпенов капсулного экстракта составом для биозащиты от стрессовых факторов и повышенным содержанием в нем фракции монотерпеноидов сырья осуществляют на неблагоприятном для деревьев фоне.

Это могут быть естественные стрессовые факторы (резкие колебания между дневными и ночных температурами, поражение паразитирующими мхами, лишайниками и т.д.) или специально спровоцированные (кратковременное простукивание ствола деревьев, механическое давление на кору деревьев и т.д.).

Собранные таким образом сырье представляет собой полупрозрачную жидкость янтарно-желтого цвета со специфическим запахом.

Физико-химический анализ показал;

$d_H^{20}=1,0315$; $\Pi_D^{20}=1,5130$; $LD=-12^\circ$;

ПМР: 0,82; 1,67; 4,71; 5,77 м.д. (C_6D_6).

Данные элементного анализа:

C 77,82; H 10,19; S нет; N нет.

Из полученного капсулного экстракта, имеющего такие характеристики, получают фракцию монотерпеноидов по известному способу (RU, патент № 2054945 от 27.02.1996). 0,5 мл монотерпеновых соединений смешивают при комнатной температуре ($18-25^\circ C$) с 97,5 мл капсулного экстракта с дальнейшим растворением полученной субстанции в 402 мл растительного масла (оливковое, подсолнечное, соевое и т.д.).

Полученная по такому способу терпеноидная фармацевтическая композиция "Абисилин" представляет собой густую жидкость от желтого прозрачного до молочно-белого цвета со специфическим запахом. Она легко растворима в хлороформе и растительных маслах: оливковом, соевом подсолнечном, но практически не растворима в воде.

Химический и количественный состав фармацевтической композиции "Абисилин" изучали методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) на хроматографе ЛХМ-7А с детектором по теплопроводности (катарометром) и насыпной колонкой длиной 3,0 м, диаметром 5 мм, стационарная фаза "Apiezon-L" на полихроме, расход газа-носителя (гелий) 30 мл/мин, температура колонки $125^\circ C$, температура испарителя $180^\circ C$. Идентификация основных компонентов проведена по относительным временам удерживания (ОВУ) и методом подсадки соединений-свидетелей.

При этом было установлено, что композиция "Абисилин" содержит монотерпеноиды: сантен, камфорен, α -пинен, Δ^3 -карен, лимонен, трициклен, β -пинен, мирцен, β -фелландрен, тернинолен, 1,8-цинеол, β -терпинен, цитраль, борнилацетал, изоборнеол, борнеол, камфора, атерпенеол, гераниол, сабиненгидрат. Фракция сесквитерпеноидов, составляющая 3-6% массовой доли, включает: базаболен, кариофиллен, α -гимулен, β -мурулен, α -селинен, α -мурулен, β -фарнезен, β -кадинен, хамазаулен, акуркумен, элема-зулен.

В состав нейтральных дитерпенов, составляющих (11-15% массовой доли) входят углеводороды (тунберген, пимародиен), окси (маноилоксил), спирты (абиенол, пимаринол, лариксол) и альдегиды (левопимараль). Дитерпеновые кислоты, составляющие 23-25% массовой доли, представлены: абietиновой, пимаровой, изопимаровой, неоабиетиновой, дегидроабиетиновой, палюстровой, сандропимаровой, сильвиновой. Композиция "Абисилин" включает также ряд тритерпеновых кислот, составляющих 8-16% массовой доли, таких как абисеновая, абисолидовая, фирманская, β -ацилакриловая.

Ненасыщенные и насыщенные жирные кислоты, составляющие 0,1-0,3% массовой доли, такие как: яблочная, лимонная, винная, щавелевоуксусная, галловая и др. кислоты, жирные кислоты, подобные олеиновой, линолевой, линоленовой и др.

Композиция "Абисилин" включает фенольные соединения, составляющие 0,1-0,2% массовой доли, такие как: простые фенолы (фенилы, фенолоспирты, фенолокислоты, кумарины и др.), фенолы с двумя ароматическими кольцами (флавоноиды, флавоны, изофлавоноиды и др.) полимерные фенолы (полифенолы)-дубильные вещества или танины, кахетины и т.п.

Таким образом, при получении композиции "Абисилин" использованы отличительные признаки, не использовавшиеся ранее при разработке различных способов получения растительных экстрактов, в том числе и при получении известной терпеноидной субстанции Абисил-1 (RU, патент № 2054945 и RU патент № 2198653 от 29.03.2002). Он заключается в возможности получения соединений, которые синтезируются представителями рода пихт (Abies) в ответ на стрессовые воздействия и обогащении усиленной фракцией монотерпеноидов, которая является высокоактивной, но в индивидуальном использовании проявляет токсичность. Терпеноидная композиция "Абисилин", полученная таким образом, имеет наи-

более эффективный состав и не оказывает токсических воздействий.

Пример 1.

При определении острой токсичности в максимально возможной дозе 10000 мг/кг не наблюдали гибели животных, что позволяет отнести его к IV классу опасности в соответствии с ГОСТ-ом 12.1.007-76.

Субхронический эксперимент проведен на нелинейных крысах-самцах и самках со средней массой 165 ± 3 г и 163 ± 3 г соответственно. Исследуемый препарат вводили внутрижелудочно ежедневно однократно в течение 14 дней в дозе 100, 500 и 1000 мг/кг самцам и в дозе 100 и 1000 мг/кг самкам.

По результатам проведенного эксперимента Абисилин в изученных дозах не вызвал достоверных изменений в интегральных показателях у подопытных животных (прирост массы тела, поведенческие реакции, потребление пищи, воды), клеточном составе периферической крови, выделительной, поглотительной, белоксинтезирующей, углеводной функции печени, уровне содержания холестерина в сыворотке крови, функциональном состоянии сердечно-сосудистой, выделительной и нервной системы.

Использование Абисилина в дозе 1000 мг/кг, т.е. в 10 раз превышающую рекомендуемую терапевтическую, вызывает слабое местное раздражающее действие на слизистую желудочно-кишечного тракта только у части животных.

Таким образом, проведенное изучение общетоксического действия Абисилина в исследованных дозах показало, что его использование не вызывает структурных нарушений в органах и тканях.

Пример 2. Цитотоксическая и апоптозиндуцирующая активность Абисилина, полученного по примеру 1*, в отношении опухолевых клеток.

Исследования проводили в опытах *in vitro* на опухолевых клеточных линиях: Т-клеточный лимфобластозный лейкоз-Jurkat, В клеточный лейкоз-Raji, хронический миелогенный лейкоз-K562, миелолейкоз-U937, меланома-Mel P, рак молочной железы-T 47 D, рак яичников-SKOV-3, рак предстательной железы-PC-3.

Клеточные линии выращивали в полной питательной среде RPMI-1640, содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки, 2тМ/мл глютамина, 0,1 мг/мл гентамицина, витамины, пируват натрия, аминокислоты, при 37°C и в атмосфере 5% CO_2 .

Для исследования использовали следующие концентрации препарата Абисилин: 300 мкг/мл, 500 мкг/мл, 800 мкг/мл, 1000 мкг/мл. При разведении препарата применяли 1% раствор ДМСО (диметилсульфоксида).

Определение цитотоксической активности Абисилина проводили колометрическим методом с использованием МТТ-теста. Опухолевые клетки в концентрации 5×10^4 клеток/мл засевали в 96-луночные плоскодонные планшеты (Sarshted), добавляли по 20 мкл препарата в исследуемых концентрациях и инкубировали 72 ч в стандартных условиях (каждую концентрацию препарата исследовали в триплетах). В качестве контроля использовали триплет лунок без препарата и триплет лунок с добавлением 20 мкл 1% ДМСО. За 5 ч до окончания инкубации в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора МТТ (Sigma, Chemical Co, США). После окончания инкубации клетки осаждали центрифугированием планшетов при 1000 об/мин в течение 2-3 мин. Супернатант аккуратно отбирали и в каждую лунку добавляли по 200 мкл ДМСО (ICN Biomedicals, Inc)-растворитель кристаллов формазана. Клетки ресуспенсировали и инкубировали 10 мин при 37°C , после чего измеряли оптическую плотность (ОП) раствора на анализаторе иммуноферментных реакций "Униплан" АИФР-01 (Россия) при длине волны 540 нм. МТТ метаболизируется жизнеспособными клетками, превращаясь в нерастворимый в воде формазан, тем самым, изменяя оптическую плотность раствора пропорционально количеству выживших клеток. Опухолевые клетки считали чувствительными к исследуемому препаратуре, если количество погибших клеток в культуре составляло не менее 50%. Каждый эксперимент повторяли 3 раза. Процент выживаемости определяли по формуле (среднее значение ОП в опыте/среднее значение ОП в контроле) $\times 100\%$.

Выявление апоптических клеток проводилось методом двойного приживенного окрашивания с использованием Аннексина V- FITC в комбинации с таким витальным красителем, как пропедиум иодид (PI).

Окрашенные по Аннексину V-FITC и PI клетки оценивали по следующим критериям: живые клетки отрицательные по Аннексину V и PI ($\text{AnV}^- \text{PI}^-$), ранние апоптические клетки положительные по Аннексину V и отрицательные по PI ($\text{AnV}^+ \text{PI}^-$), поздние апоптические или некротические клетки положительные по Аннексину V и по PI ($\text{AnV}^+ \text{PI}^+$). В качестве контроля использовали опухолевые клетки, которые инкубировали в тех же условиях, но в отсутствии препарата, а также опухолевые клетки, которые инкубировали в тех же условиях, но вместо препарата добавляли раствор 1% ДМСО.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программы Statistica 6.0. При сопоставлении средних величин использовали критерий значимости Стьюдента (различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$).

Проведенные исследования показали, что инкубация опухолевых клеток с препаратом "Абисилин" выявляет его цитотоксическое действие в отношении клеточных линий Jurkat, Raji и PC-3. Кривые выживаемости опухолевых клеток под воздействием препарата представлены на фиг. 1.

Наиболее выраженное цитотоксическое действие препарат "Абисилин" проявил по отношению кле-

точной линии Jurkat и составил 41,8% при использовании концентрации препарата в 1000 мг/мл. С увеличением концентрации Абисилина уменьшался процент живых опухолевых клеток и наоборот.

При исследовании препарата Абисилин в отношении опухолевых клеток U937, K562, T 47 D, SKOV-3, Mel P цитотоксического эффекта выявлено не было.

Определение апоптоза индуцированного действием препарата Абисилин с использованием метода прижизненного двойного окрашивания Annexin V/PI было проведено на опухолевых клетках линий Jurkat, Raji, PC-3, U937 в концентрации препарата 300 и 1000 мкг.

Установлено, что Абисилин вызывает гибель опухолевых клеток исследованных линий по типу апоптоза (табл. 1).

Таблица 1. Результаты исследования абисилин-индуцированного апоптоза

Препарат	Суммарное количество опухолевых клеток положительных по AnV ⁺ PI ⁻ , AnV ⁺ PI ⁺ , AnV-PI ⁺ , в %			
	Jurkat	Raji	PC - 3	U 937
Контроль (1% ДМСО)	26,0	23,1	33,1	1,7
Абисилин, 300 мкг/мл	53,3*	27,9	56,7 *	7,4
Абисилин, 1000 мкг/мл	86,6*	44,9*	62,4*	38,2*

Примечание: * $p < 0,05$ -достоверность различия между опытом и контролем.

Причем выявлено, что с увеличением концентрации Абисилина число апоптических клеток значительно увеличивалось. Наибольшее количество клеток в сумме положительных по AnV⁺PI⁻, AnV⁺PI⁺, AnV-PI⁺ было выявлено по отношению к клеточной линии Jurkat и составило 86,6% при использовании дозы Абисилина 1000 мкг/мл.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о способности препарата Абисилин оказывать избирательное цитотоксическое действие на опухолевые клетки и вызывать их гибель по типу апоптоза, что значительно повышает возможности противоопухолевой терапии с использованием антиангиогенных препаратов.

Кроме того, данный аспект изобретения расширяет сферу использования известной полиактивной терпеноидной субстанции Абисил и фармацевтических композиций, полученных на ее основе, рекомендованных для местного и наружного применения, так как к установленным спектрам действия (антибактериальное, иммуномодулирующее, противовоспалительное, ранозаживляющее, обезболивающее) добавляются неожиданно выявленные и имеющие большую терапевтическую значимость виды воздействий, а именно: способность вызывать цитотоксические эффекты на некоторых линиях опухолевых клеток, протекающих по типу апоптоза.

Это позволяет рекомендовать известную фармацевтическую композицию Абисил и предлагаемую Абисилин, в качестве агентов, способных повысить эффективность хирургического лечения опухолевых заболеваний.

Пример 3. Изучение противоопухолевого действия пероральной фармацевтической композиции Абисилин, полученной по примеру 1*, на перевиваемых опухолях.

Противоопухолевое действие препарата Абисилин изучали на перевиваемых опухолях мышей, входящих в число обязательных моделей опухолей животных, которые используются при отборе новых противоопухолевых веществ; меланоме B-16, эпидермоидной карциноме легкого Льюис (LLC), аденокарциноме молочной железы Ca-755, раке шейки матки РШМ-5, аденокарциноме толстой кишки АКАТОЛ, полиморфноклеточной саркоме M-1.

Работа выполнена на мышах-гибридах первого поколения BDF (C BI/6 x DBA/2) и F (C D1/6 и CBA/2), мышах линий CBA/2, BALB/c, DBA/2 самках и самцах массой 20-25 г., а также на самках беспородных крыс массой 200-250 г. Мышей и крыс получали из отдела лабораторных животных ГУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН и содержали на обычном рационе питания.

Препарат Абисилин применяли перорально (per os) в виде масляного раствора в дозах 10, 100, 150, 500, 2500 мг/кг. В качестве растворителя препарата использовалось растительное подсолнечное масло.

Изучалась также возможность комбинированного применения терпеноидного препарата Абисилин и противоопухолевого средства, принадлежащего к группе алкилирующих химиотерапевтических агентов широкого спектра. Для опытов использовался Цисплатин, полученный от Bristol Meyers-Squibbs.

Препарат "Абисилин" вводили животным ежедневно перорально в течение 10 дней, а также в режимах: на 2-ой и 6-ой дни и 2-ой и 11-ый дни. Лечение начинали через 48 ч после перевивки солидных опухолей (Ca-755, АКАТОЛ, меланома B-16, LLC, РШМ-5, M-1). При сочетанном лечении препарат Абисилин вводили мышам ежедневно перорально в течение 10 дней через 48 ч после перевивки опухоли в дозе 50 мг/кг, а противоопухолевый препарат Цисплатин-однократно внутрибрюшинно (в/бр) в дозе 5 мг/кг. Наблюдение за животными с перечисленными выше опухолями проводили до их гибели. О противоопухолевых эффектах препарата судили по торможению роста опухоли (TRO, %) подопытных животных по сравнению с контрольными.

Токсичность препаратов оценивалась по ранней гибели мышей по сравнению с гибелью контроль-

ных животных и состоянию их внутренних органов (селезенка, печень и др.), изменению массы тела по сравнению с исходной.

Статистическую значимость противоопухолевого эффекта по отношению к не леченному контролю определялась по методу Фишера-Стьюдента. Различия между сравниваемыми группами считались статистически достоверными при $p<0,05$.

Результаты проведенных исследований по изучению противоопухолевой активности препарата Абисилин на перевиваемых солидных опухолях представлены в табл. 2.

Таблица 2. Изучение противоопухолевой активности препарата Абисилин при пероральном введении на перевиваемых опухолях

Доза (мг/кг)	Дни введе-ния	TPO, % / дни после перевивки опухоли ($p < 0,05$)					
		меланома B-16	Ca - 755	LLC	РШМ - 5	АКАТОЛ	саркома M - 1
10	2 - 11	66 / 13	59 / 7	н/с	±	н/с	н/с
100	2 - 11	63 / 7	62 / 7, 65 / 10	56 / 7	±	±	54 / 7
150	2 - 11	н/с	н/с	57 / 7	61 / 7	н/с	н/с
500	2 - 11	±	±	±	±	26 / 7	±
2500	2 и 6	62 / 7	±	±	±	26 / 28	н/с
2500	2 и 11	±	±	60 / 13	±	н/с	68 / 7, 53 / 16

Примечание: знак "±" означает ТРО,% при $p>0,05$ по отношению к контролю, н/с-исследование не проводилось.

Исследования показали, что на перевиваемой меланоме B-16 препарат Абисилин проявил кратковременный умеренный противоопухолевый эффект только в дозах 10 и 100 мг/кг при его введении в течение 10 дней-ТРО=66% (на 13 день опыта) и 63% (на 7 день опыта, $p<0,05$) соответственно, а также в дозе 2500 мг/кг при двукратном введении с интервалом в 5 дней (ТРО=62%) на 7 день опыта. В то же время препарат был не эффективен в доз 500 мг/кг при 10-ти дневном введении и в дозе 2500 мг/кг при двукратном введении с интервалом в 10 дней.

На аденокарциноме молочной железы Ca-755 статистически значимый эффект был выявлен в дозе 10 мг/кг (ТРО составило 59% на 7 день опыта) и в дозе 100 мг/кг (ТРО=62% на 7 день и 65% на 10 день). В последующие дни противоопухолевая активность постепенно снижалась.

На эпидермоидной карциноме легкого Льюис (LLC) противоопухолевый эффект препарата зарегистрирован в дозе 100 мг/кг и 150 мг/кг при пероральном введении на 7 день после перевивки опухоли: ТРО=56% и 57%, соответственно ($p<0,05$). На этой же опухоли выявлен умеренный противоопухолевый эффект Абисилина в дозе 2500 мг/кг-ТРО=60% на 13 день опыта при двукратном введении с 10-ти дневным перерывом.

Максимальное торможение роста опухоли на ранних сроках лечения рака шейки матки (РШМ-5) у мышей отмечено на 7-ые сутки опыта в дозе 150 мг/кг (ТРО=61%), т.е. после 5-ти кратного перорального введения препарата.

На аденокарциноме толстой кишки мышей АКАТОЛ препарат Абисилин был не эффективен в дозах 50 мг/кг и 100 мг/кг в режиме 10-ти дневного введения. Однако препарат проявлял слабый противоопухолевый эффект на 7-й день от начала лечения в дозе 500 мг/кг при 10-ти дневном введении (ТРО=26%) и на 28-й день от начала лечения в дозе 2500 мг/кг в режиме двукратного введения с 5-ти дневным интервалом (ТРО=26%).

На перевиваемой саркоме M-1 крыс препарат Абисилин проявлял умеренную противоопухолевую эффективность непосредственно после пяти введений в дозе 100 мг/кг на 7 день опыта: ТРО=54%, ($p<0,05$). Наблюдался также противоопухолевый эффект препарата при двукратном введении (на 2-ой и 11 дни после перевивки опухоли) в дозе 2500 мг/кг на 7-ой и 16-й дни от начала лечения (ТРО=68% и 53%, соответственно).

В изученных дозах у всех взятых в опыты животных с перевиваемыми опухолями проявлений токсичности препарата Абисилин не выявлено. Терапевтическая доза препарата Абисилин в опытах при изучении противоопухолевой активности на перевиваемых опухолях составила 100 мг/кг при ежедневном пероральном введении в течение 5-ти дней.

Противоопухолевая активность препарата Абисилин изучена также в сочетании с известным противоопухолевым препаратом Цисплатин на перевиваемой аденокарциноме толстой кишки АКАТОЛ, аденокарциноме молочной железы Ca-755 и меланоме B-16 мышей при использовании их в дозе равной 1/2 терапевтической при монотерапии (табл. 3).

Таблица 3. Противоопухолевая активность препарата Абисилин в сочетании с Цисплатином на перевиваемых опухолях АКАТОЛ, Са-755 и меланоме В-16

Препарат	Доза (мг/кг)	Дни введения	Путь введения	ТРО, % / дни после перевивки опухоли		
				АКАТОЛ	Са - 755	меланома В-16
Абисилин + Цисплатин	50 + 5	2 -11	per os	38*/7, 62*/12, 40*/21, 45*/28	91*/7, 83*/11, 66*/14, 54*/18, 49/22	75/7, 74/9, 63/11, 32/17
Абисилин	50	2 - 11	per os	8/7, 9/12, 3/21, 6/28	13/7, 0/11, 7/14, 6/18, 6/22	19/7, 62/9, 23/11, 12/17
Цисплатин	5	2	в/бр	0/7, 22/12, 14/21, 35/22	86/7, 62/11, 52/14, 43/18, 39/22	80/7, 83/9, 65/11, 19/17

Примечание: *-р <0,05 по отношению к Цисплатину.

Из данных табл. 3 видно, что аденокарцинома толстой кишки АКАТОЛ не чувствительна к препаратам Абисилин и Цисплатину при использовании их в монотерапии. В тоже время при сочетании применения этих препаратов наблюдался терапевтический эффект в течение 21 дня (ТРО=38%-62%).

На перевиваемой аденокарциноме молочной железы Са-755 в результате сочтанного применения препаратов Абисилин и Цисплатин получен суммированный противоопухолевый эффект в течение 15-ти дней: ТРО=91% против 86% через 7 дней, 83% против 62% через 11 дней, 66% против 52% через 14 дней, 54% против 43% через 18 дней и 49% против 39% через 22 дня. Кроме того, выявлено, что сочтанное применение препаратов увеличивало продолжительность жизни животных до 20%.

Сочтанное применение препаратов Абисилин и Цисплатин на перевиваемой меланоме В-16 мышей не показало преимущества противоопухолевого действия на этой опухоли по сравнению с использованием Цисплатина в монотерапии.

Умеренный противоопухолевый эффект препарата Абисилин, установленный на 5-ти из 6-ти взятых в исследование перевиваемых солидных опухолей, а также повышение чувствительности некоторых опухолей (АКАТОЛ, Са-755) при совместном использовании с Цисплатином дает основание предполагать применение Абисилина для лечения злокачественных опухолей в комбинированной химиотерапии при сочетании с другими противоопухолевыми препаратами.

Таким образом, проведенные исследования показали, что поликомпонентный терпеноидный препарат Абисилин, при пероральном введении, обладает умеренной противоопухолевой активностью в отношении перевиваемых солидных опухолей (Са-755, меланома В-16, LLC, РШМ-5, саркома М-1).

Кроме того, установлено, что сочетанное применение препаратов Абисилин и Цисплатин в 1/2 терапевтической дозе повышает противоопухолевый эффект в опытах на животных с перевиваемыми опухолями.

Терапевтическая доза препарата Абисилин при ежедневном пероральном введении животным с перевиваемыми солидными опухолями составила 100 мг/кг.

Препарат Абисилин не вызывал токсических проявлений в суммарной дозе 5000 мг/кг как при ежедневном введении в дозе 500 мг/кг в течение 10 дней, так и при двукратном введении в дозе 2500 мг/кг с интервалом в 4 и 9 дней.

Пример 4. Антиангиогенные свойства Абисилина, полученного по примеру 1*, в опытах *in vitro* и *in vivo*.

При изучении антиангиогенных свойств препарата "Абисилин" были использованы культуры эндотелиальных клеток мыши SVEC-4-10, трансформированные вирусом SV40 [Walter-Yohrling J., et al. Clin Cancer Res 2004; 10:2179-2189].

Раствор препарата Абисилин готовился в стоковой концентрации 10 мг/мл (10% ДМСО/PBS) в лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМы в день постановки экспериментов. Препарат до необходимой в исследовании концентрации разводили в 1% PBS.

Все эксперименты были повторены не менее 4 раз.

Антиангиогенные свойства препарата "Абисилин" могут быть продемонстрированы *in vitro* и *in vivo* по следующей методике.

1. Цитотоксическое действие Абисилина на эндотелиальные клетки проведено при инкубации препарата в течение 24 ч с клетками линии SVEC-4-10, высаженных в высокой плотности.

По нашим данным Абисилин вызывает гибель эндотелиальных клеток в диапазоне концентраций от 1 мг/мл до 0,125 мг/мл (фиг. 2). ЛД₅₀ составило 0,21 мг/мл.

2. Антипролиферативное действие Абисилина оценено при изучении влияния Абисилина на пролиферативную активность активированных bFGF эндотелиальных клеток SVEC4-10, высаженных в низкой плотности.

Показано, что Абисилин блокирует пролиферацию эндотелиальных клеток SVEC4-10 в диапазоне

концентраций от 1 мг/мл до 0,125 мг/мл (ИК₅₀=0,09 мг/мл).

В двух нецитотоксических концентрациях (0,0625 мг/мл и 0,031 мг/мл) наблюдается блокирование пролиферации эндотелиальных клеток на 20% (фиг. 3).

3. Антимиграционное действие Абисилина была оценена при использовании метода ингибиования миграции культуры эндотелиальных клеток мыши SVEC-4-10 (метод «раневой поверхности») на диапазоне доз препарата от 0,25 мг/мл до 0,031 мг/мл (фиг. 4 и 5).

Наблюдалось блокирование миграции эндотелиальных клеток «в рану» на 89% при концентрации Абисилина 0,25 мг/мл. Абисилин не блокирует миграцию эндотелиальных клеток «в рану» в нецитотоксических концентрациях (0,0625 мг/мл и 0,031 мг/мл).

4. Действие Абисилина на трубочно-подобные структуры.

Способность Абисилина блокировать образование трубочно-подобные структуры эндотелиальных клеток, была оценена в диапазоне доз препарата от 0,125 до 0,015 мг/мл.

Исследование показало, что Абисилин частично блокирует образование трубочно-подобных структур в концентрации 0,125 мг/мл. Наблюдаемые трубочки являются короткими, незамкнутыми и не ограничены контактами с другими трубочками. При концентрации Абисилина 0,0625, 0,031 и 0,015 мг/мл блокирования образования трубочно-подобных структур не наблюдалось (фиг. 6).

5. Действие Абисилина на ангиогенез в имплантанте Матригеля. Исследование антиангиогенного действия Абисилина *in vivo* проводилось по способности ингибировать ангиогенез в имплантанте Матригеля с введенным стимулятором ангиогенеза bFGF. Абисилин вводился перорально каждый день в течение 7 дней в концентрациях 2,1 и 0,2 мг/мл.

Исследование показало, что Абисилин в изученных концентрациях дозозависимо блокирует образование сосудов в Матригеле (фиг. 7). Максимальное блокирование наблюдалось при концентрациях Абисилина 2 и 1 мг/мл, при концентрации 0,2 мг/мл наблюдалось частичное блокирование образования новых сосудов в имплантанте Матригеля. На гистологических срезах имплантанта Матригеля, окрашенных гематоксилином и эозином, наблюдается дозозависимое снижение количества эндотелиальных клеток и стромальных элементов при кормлении мышей Абисилином.

Таким образом показано, что препарат Абисилин обладает антиангиогенными свойствами в эксперименте *in vivo* и *in vitro*. Полученные данные представляют практическую значимость, заключающуюся в возможности использования Абисилина по указанному способу в качестве агента, способного блокировать ангиогенез злокачественных опухолей, тем более, что к настоящему времени не известны и неочевидны способы получения таких поликактивных нетоксичных средств с одновременным противоопухолевым и антиангиогенным действием.

Пример 5. Антирецидивное и антиметастатическое действие Абисилина, полученного по примеру 1*.

При экспериментальной разработке способа ингибиования процессов метастазирования и развития рецидивов злокачественных новообразований использовали мышей линии C₅₇BL₆ и гибридов первого поколения BDF1, массой 20-25 г, с подкожно трансплантированной карциномой легкого Льюис. Мышей получали из отдела лаборатории животных ГУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН и содержали на обычном рационе питания. Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с международными правилами работы с животными.

Препарат Абисилин применяли перорально в виде масляного раствора в диапазоне доз от 60 до 400 мг/кг. В качестве растворителя препарата использовалось подсолнечное масло. В контрольной и в группе, получавшей лечение, было от 7 до 10 животных.

Оценку противоопухолевой, антирецидивной и антиметастатической активности препарата Абисилин проводили в соответствии с методическими рекомендациями, изложенными в "Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ", 2005 г.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по критериям Стьюдента.

Изучение влияния препарата Абисилин на частоту и сроки появления экспериментальных опухолей и динамику их развития проводилось после индукции искусственных рецидивов путем трансплантации 1×10⁵ клеток карциномы легкого Льюис под шов, наложенный на предварительно произведенный разрез кожного покрова мыши.

Пероральное применение Абисилина в дозах 100 мг/кг и 400 мг/кг в течение 10-ти дней оказывало выраженное антирецидивное действие. Так в группе животных, получавших Абисилин, после трансплантации опухолевых клеток, в дозе 400 мг/кг у 2-х из 7 животных рецидивы появились только спустя 14 дней, а в группе животных, получавших Абисилин в дозе 100 мг/кг, рецидивы появились только у 3 из 7 животных к 12 суткам опыта. Более того, у оставшейся части животных искусственные рецидивы не были обнаружены в течение более 90 дней наблюдения.

При изучении влияния перорального применения Абисилина (в течение 10 дней в дозах 60, 120 и 360 мг/кг) на рост и метастазирование искусственных рецидивов выявлено, что применение Абисилина не только ингибировало динамику появления и рост искусственных карцином легкого Льюис, но и снижало в дозе 120 мг/кг процесс метастазирования рецидивных опухолей на 46% (табл. 4). При этом несмотря на то, что метастазы при забое на 33-и сутки были выявлены у всех леченных и контрольных жи-

вотных, средняя масса легких, пораженных метастазами, была равна $241,0 \pm 36,0$ мг по сравнению с $449,7 \pm 146,1$ мг у контрольных животных.

Влияние Абисилина (в дозе 60, 100 или 120 мг/кг, перорально, пятикратно, до-, после-, или до -и- после хирургического удаления первичного опухолевого узла) на процесс спонтанного рецидивирования и метастазирования карциномы легких Льюис зависело от режима его применения (табл. 5).

В случае применения препарата в дозе 60 мг/кг наилучший эффект получен в режиме послеоперационной терапии (режим адьювантной терапии). К 27 суткам опыта рецидивы возникли у 3/7 мышей данной группы, по сравнению 6/7 контрольной группы. Применение предоперационного, а также комбинированного (пред- и послеоперационного) режима было менее эффективным. В то же время применение Абисилина в дозе 120 мг/кг оказалось наиболее эффективным в предоперационном режиме. При забое животных на 35 сутки опыта для оценки влияния проведенной терапии на процесс метастазирования карциномы Льюис получены данные, свидетельствующие о том, что при использовании Абисилина в дозе 60 мг/кг также наиболее эффективен режим послеоперационной терапии (режим адьювантной терапии). У животных, получавших Абисилин в соответствии с этим режимом (перорально, в дозе 60 мг/кг, в течение 5 дней после удаления первичной опухоли), отмечено торможение процесса метастазирования на 45% (средняя масса легких, пораженная метастазами у леченных животных $393,3 \pm 160,0$ мг, по сравнению с $709,4 \pm 237,3$ мг у контрольных).

Пример 6.

Больная Д., 44 года, находилась на амбулаторном лечении с диагнозом: ревматоидный артрит, полиартрит, медленно прогрессирующее течение, активность II степени, II стадия, ФНС П, серопозитивный. Согласилась принимать препарат. Назначено лечение: прием Абисилина, полученного по примеру 1*, перорально из расчета 0,1 мл/кг один раз в сутки в течение 15 дней и местно салфетки с раствором Абисилина на область коленных и левого голеностопного суставов, салфетки применяла ежедневно не менее 7-8 ч.

В результате проведенного лечения на третий день отмечено улучшение общего состояния, уменьшение болей, утреней скованности, уменьшение окружностей коленных и левого голеностопного сустава, улучшение суставного индекса по Ричи. К концу лечения боли и скованности в суставах нет, значительное улучшение общего состояния. Побочных действий и аллергических реакций не выявлено.

Пример 7.

Больной В., 40 лет, находился на амбулаторном лечении с диагнозом: псориаз, вульгарная форма, прогрессирующая стадия. Болеет 7 лет. До начала лечения имелись псориатические элементы на коже разгибательных поверхностей конечностей и туловища, беспокоил зуд. Согласился принимать препарат Абисилин. Назначено лечение: прием Абисилина, полученного по примеру 1*, перорально из расчета 0,1 мл/кг один раз в сутки в течение 25 дней и местно салфетки с раствором Абисилина на очаги поражения под повязку ежедневно не менее 10-12 ч.

Клинически к 5 дню отмечено значительное улучшение субъективных ощущений (зуда, чувства стянутости кожи), клинически псориатические элементы побледнели, значительно уменьшилось шелушение на их поверхности, элементы упали, уменьшилась инфильтрация. К концу лечения на месте псориатических элементов остались слабопигментированные пятна. Побочных эффектов, аллергических реакций, появления новых очагов поражения не наблюдалось.

Таблица 4. Влияние Абисилина на динамику появления рост и метастазирование искусственных рецидивов карциномы легких Льюис у мышей C57B1/6

№	Воздействие	Сутки после прививки (количество мышей с рецидивами)			Забой животных на 33 сутки				Частота метаста- зирования	
		рецидив		легкие						
		Ср. масса	ТРО	Ср. масса	TPM					
		6	10	13	г	%	мг	%		
1	операция + масло per os 0,1 мл/мышь \times 10 р. (1-10с.)	2/7 (29%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	5,7 \pm 2,0		449,7 \pm 146,1		7/7 1+;5++;1+++	
2	операция +Абисилин per os 60 мг/кг \times 10 р. (1-10с.)	2/7 (29%)	6/7 (86%)	7/7 (100%)	4,8 \pm 2,3	25	438,9 \pm 228,2	2	7/7 4+;1++;2+++	
3	операция +Абисилин per os 120 мг/кг \times 10 р. (1-10с.)	1/7 (14%)	6/7 (86%)	7/7 (100%)	5,1 \pm 1,2	20	241,0 \pm 36,0	46	7/7 5+,2++	
4	операция +Абисилин per os 360 мг/кг+ наружно \times 10р. (1-10с.)	4/7 (57%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	4,5 \pm 2,8	30	406,0 \pm 41,0	10	7/7 1+;3++;3+++	

Примечание: *-соотношение числа животных с рецидивами к общему числу животных в группе;
+-меньше 10, ++-от 10 до 30, +++-больше 30 метастазов.

Таблица 5. Влияние Абисилина на спонтанное рецидивирование и метастазирование карциномы легкого Льюис на фоне хирургического удаления первичных опухолей

№	Воздействие	Сутки опыта, Количество мышей с рецидивом		Забой животных на 35 сутки				Частота метастазирования	
		Рецидив		Легкие					
		Ср. масса	ТРО	Ср. масса	ТРМ				
		14	19	27	г	%	мг	%	
1	Масло per os 0,1мл/мышь × 5р.(3-7с) + операция (7с.) + Масло per os 0,1мл/мышь × 5р.(8-12с)	0/7	4/7	6/7	4,8 ± 2,4		709,4±237,3		
2	Абисилин per os 60мг/кг × 5р.(3-7с.) + операция (8с.)	1/7	5/7	5/7	5,7 ± 2,1	+18	883,6±352,7	+25 7/7 [1++;6++]	
3	Абисилин per os 60мг/кг × 5р.(3-7с.) + операция (7с.) + Абисилин per os 60мг/кг × 5р.(8-12с.)	0/7	6/7	6/7	6,0 ± 1,8	+25	471,7±167,8	34 6/6 [1++;5++]	
4	операция (7с.) + Абисилин per os 60мг/кг × 5р.(8-12с.)	2/7	4/7	5/7	5,8 ± 2,6	+20	393,3±160,0	5 7/7 [4++;3++]	
5	операция (7с.) + Абисилин per os 60мг/кг × 10р.(8-17с.)	0/7	3/7	3/7	5,3 ± 3,5	11	560,4±338,3	21 7/7 [1+;1++; 5++]	
6	Абисилин per os 120мг/кг × 5р.(3-7с.) + операция (8с.)	1/7	2/7	4/7	3,0 ± 2,0	38	602,7±254,7	15 6/7 [1-; 2++; 4+++]	
7	Абисилин per os 120мг/кг × 5р.(3-7с.) + операция (7с.) + Абисилин per os 120мг/кг × 5р.(8-12с.)	0/7	6/7	7/7	4,4 ± 2,3	8	758,4±435,7	+7 7/7 [1+; 2++; 4+++]	
8	операция (7с.) + Абисилин per os 120мг/кг × 5р.(8-12с.)	2/7	4/7	6/7	5,2 ± 2,7	+8	596,4±343,6	16 7/7 [2++;5++]	
9	операция (7с.) + Абисилин per os 120мг/кг × 10р.(8-17с.)	0/7	4/7	4/7	5,6 ± 4,2	+4	585,8±101,0	17 7/7 [3++;4+++]	

Примечание: *-соотношение числа животных с рецидивами к общему числу животных в группе.

+-меньше 10, ++-от 10 до 30 и +--+больше 30 метастазов.

Как следует из полученных данных, предложенный способ использования полиактивного терпеноидного препарата Абисилин, полученного по примеру 1*, при заданном режиме и пероральной лекарственной форме, позволяет достичь нужного результата, а именно: ингибировать процесс искусственного рецидивирования карциномы легкого Льюис и подавлять процесс метастазирования рецидивных опухолей (на 25-46% в разных экспериментах). Наилучший эффект достигался при пероральном применении препарата в течение 7-10 последующих дней в дозе 100-120 мг/кг. Изучение активности Абисилина в режиме адьювантной терапии (на фоне хирургического удаления первичной опухоли) выявило его способность ингибировать появление и развитие спонтанных рецидивов карциномы легкого Льюис. Наиболее эффективным оказалось применение препарата в дозе 60 мг/кг в течение 5-ти дней после хирургического удаления первичной опухоли. Применение препарата в дозе 120 мг/кг более эффективным было в предоперационном режиме. Послеоперационное пятикратное применение Абисилина на 45% ингибировало процесс метастазирования карциномы легкого Льюис па фоне хирургического удаления первичного опухолевого узла.

Таким образом, предложенный пероральный способ использования средства Абисилин, индуцирующего блокирование процессов ангиогенеза и активирующего систему апоптоза по заданным схемам и режимам, неожиданно позволил получить возможность блокировать процесс ангиогенеза при развитии злокачественных образований, а также:

оказывать антирецидивное и антиметастатическое действие;

не иметь противопоказаний;

проявлять цитотоксическое и апоптоз индуцированное действие;

иметь противоопухолевую активность на необходимых штаммах перевиваемых опухолей мышей;

при использовании в комбинации с цитотоксическими противоопухолевыми препаратами (цистами) снижать их токсичность и повышать терапевтическую эффективность;

не вызывать резистентности;

проявлять избирательность в ингибировании системы неоваскуляризации при развитии ревматоидного артрита и псориаза;

не оказывать токсического действия при пероральном использовании препарата в дозах, превышающих терапевтическую в десятки раз.

Кроме того, предлагаемое средство позволяет расширить сферу использования известной полиактивной терпеноидной субстанции Абисил и фармацевтических композиций, полученных на ее основе, рекомендованных для местного и наружного применения, в качестве агентов, способных повысить эффективность хирургического лечения опухолевых заболеваний.

Высокий терапевтический эффект препарата Абисилин при использовании для лечения ревматоидного артрита, опухолевых заболеваний и псориаза обусловлен также известной полиактивностью его субстанции Абисил, а именно: иммуномодулирующей, антибактериальной, ранозаживляющей, противовоспалительной, обезболивающей, кроме того, способной осуществлять стимуляцию синтеза специфических эндогенных гуморальных медиаторов нервных окончаний коры главного мозга.

Предлагаемый метод купирования развития злокачественных новообразований, ревматоидного артрита и псориаза дал возможность осуществить поставленную цель - выявить и разработать средство, позволяющее проявлять избирательное ингибирование или полное блокирование системы неоваскуляриза-

ции с использованием антиангиогенного, активирующего систему апоптоза терпеноидного препарата Абисилин, свободного от существующих недостатков известных средств, а именно: не оказывающего токсических побочных действий при длительном использовании, не имеющего противопоказаний, не вызывающего резистентности (в том числе к апоптозу), а также при комплексном использовании с цитостатическими препаратами не только повышающего их эффективность, но и способствующего снижению их токсичности. Кроме того, предлагаемое средство имеет ряд преимуществ перед всеми известными средствами ингибирования системы ангиогенеза-обладает прямым противоопухолевым действием, способно индуцировать систему апоптоза в клетках, оказывать антирецидивное и антиметастатическое действие, одновременно при этом проявляя иммуномодулирующее, антибактериальное, ранозаживляющее, противовоспалительное, обезболивающее и другие виды воздействия, повышающие терапевтическую значимость при лечении ревматоидного артрита и псориаза.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пероральная фармацевтическая композиция для индукции процессов ингибирования системы ангиогенеза и активации эндогенных процессов апоптоза, характеризующаяся тем, что она содержит капсулный экстракт (живицу) хвойных деревьев семейства Pinaceae, рода пихт (Abies), подвергшихся стрессу, характеризующийся следующими физико-химическими свойствами:

$$d_H^{20}=1,0315; \Pi_D^{20}=1,5130; LD=-12^\circ;$$

ПМР: 0,85; 1,67; 4,71; 5,77 м.д. (C_6D_6) и имеющий следующий элементный состав:

C 77,82; H 10,19; S нет; N нет,

фракцию монотерпеноидов, полученную из этого капсулного экстракта, и растительное масло при следующем соотношении компонентов (мл):

капсулный экстракт	97,5
--------------------	------

монотерпеноиды	0,5
----------------	-----

растительное масло	402,0
--------------------	-------

2. Композиция по п.1, в которой монотерпеноидная фракция содержит сесквитерпеноиды, нейтральные дитерпеноиды, дитерпеновые кислоты, тритерпеновые кислоты, ненасыщенные и насыщенные жирные кислоты, фенольные соединения и монотерпеноиды в массовой доле %:

сесквитерпеноиды	(3 - 6%);
------------------	-----------

нейтральные дитерпеноиды	(11 - 15%);
--------------------------	-------------

дитерпеновые кислоты	(23 - 28%);
----------------------	-------------

тритерпеновые кислоты	(8 - 16%);
-----------------------	------------

ненасыщенные и насыщенные жирные кислоты	(0,1 - 0,3%);
--	---------------

фенольные соединения	(0,1 - 0,2%);
----------------------	---------------

монотерпеноиды (остальное),

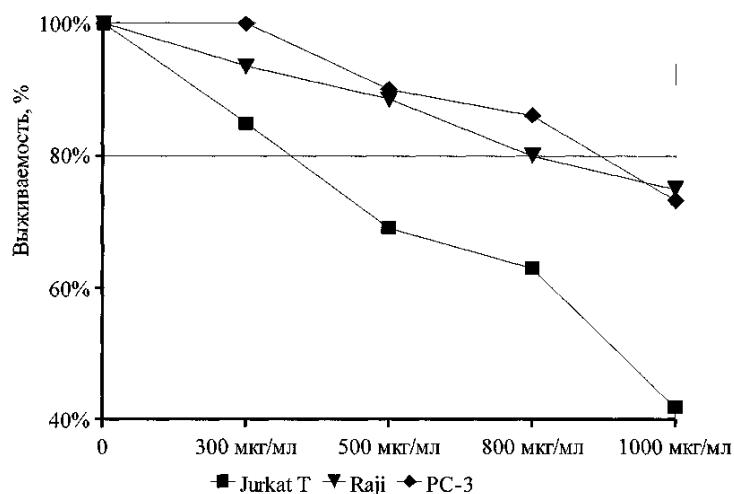
при содержании борнилацетата не менее 10,0% от общего состава терпенов.

3. Композиция по п.1, характеризующаяся тем, что оказывает выраженный цитостатический, антирецидивный и антиметастатический эффект при развитии опухолевых заболеваний.

4. Композиция по п.1, характеризующаяся тем, что она имеет терапевтическую значимость при лечении ревматоидного артрита и псориаза.

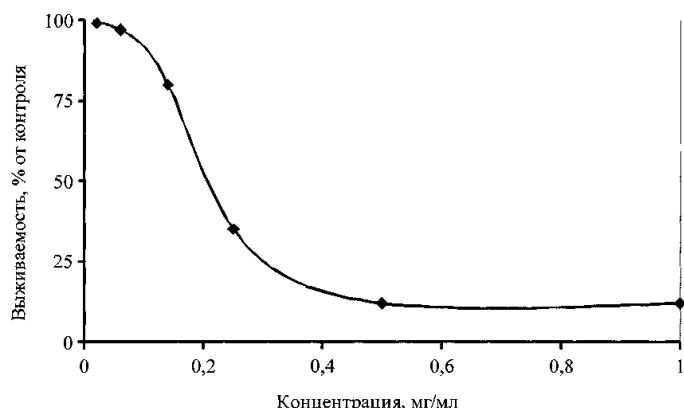
5. Препартивная форма пероральной фармацевтической композиции по п.1 в форме раствора, таблеток, желатиновых капсул, драже, сиропов, суспензий, порошков, эмульсий, гранулятов, микросфер или наносфер.

6. Комбинация пероральной фармацевтической композиции по п.1 и антибиотика или цитостатика.



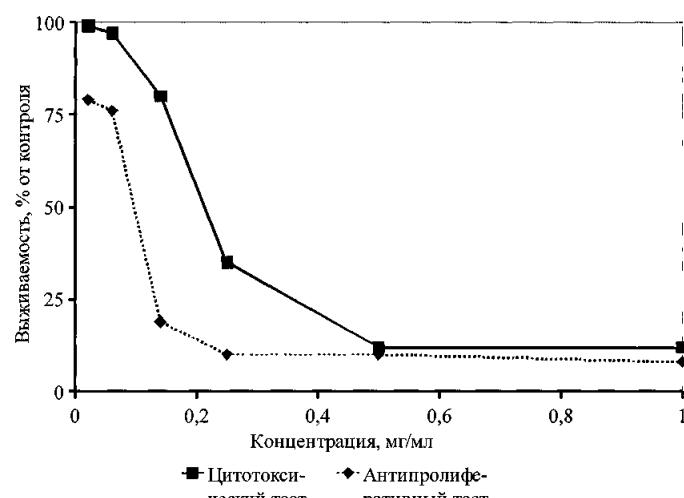
Выживаемость опухолевых клеток при инкубации с Абисилином

Фиг. 1



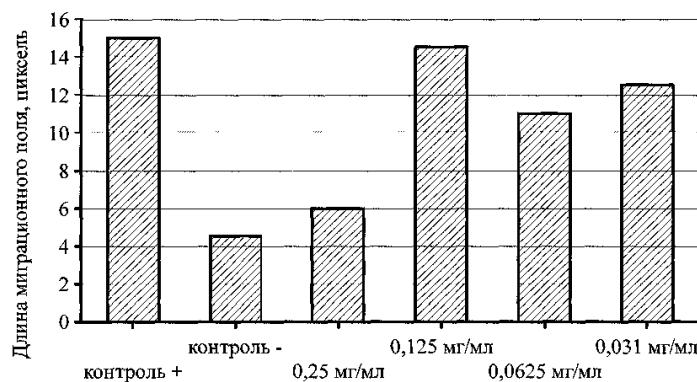
Цитотоксическое действие Абисилина на культуру эндотелиальных клеток (SVEC-4-10).

Фиг. 2



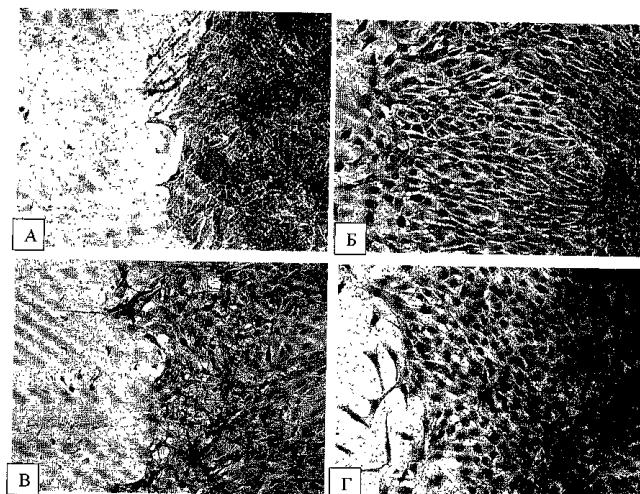
Антипролиферативное действие Абисилина на культуру эндотелиальных клеток SVEC-4-10.

Фиг. 3



Влияние Абисилина на миграцию эндотелиальных клеток SVEC-4-10 в тесте "заживление раны".

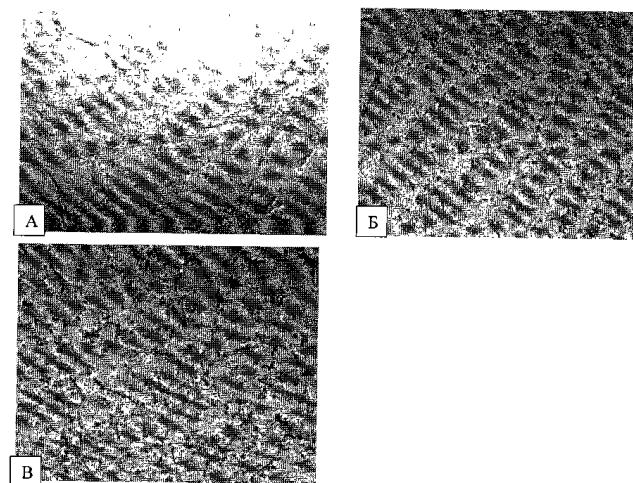
Фиг. 4



Микрофотографии миграционной активности эндотелиальных клеток SVEC-4-10, полученных при инкубации с различными дозами препарата Абисилин.

А. Отрицательный контроль. Б. Положительный контроль. В. Абисилин, 0,25 мг/мл. Г. Абисилин, 0,0625 мг/мл.

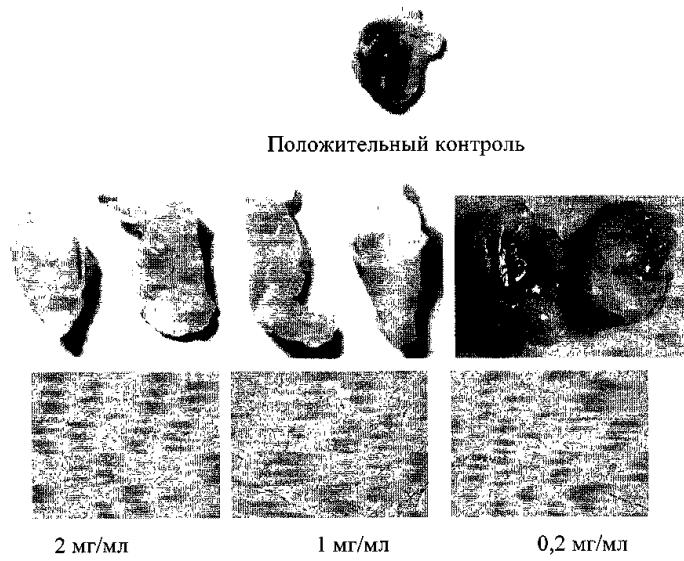
Фиг. 5



Микрофотографии трубочко-подобных структур, образованных эндотелиальными клетками SVEC-4-10, полученных при инкубации с различными дозами препарата Абисилин.

А. Контрольный образец. Б. Абисилин 0,125 мг/мл. В. Абисилин 0,0625 мг/мл.

Фиг. 6



Микрофотографии имплантантов Матригеля, выделенные из подкожной клетчатки мышей, и гистологических срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, полученных *in vivo* при пероральном введении Абисилина.

Фиг. 7



Евразийская патентная организация, ЕАПО
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2